

난소암 조직에서 HLA-G 유전자 발현과 예후 인자와의 상관성

연세대학교 의과대학 산부인과학교실, 부인암전문클리닉, 여성생명과학연구소

홍원기·김영태·윤보성·김상운·김성훈·김재훈·김재욱·박용원

Correlation of HLA-G Gene Expression with Various Prognostic Factors in the Tissue of Ovarian Carcinoma

Won Ki Hong, M.D., Young Tae Kim, M.D., Bo Sung Yoon, M.D., Sang Wun Kim, M.D.,
Sung Hoon Kim, M.D., Jae Hoon Kim, M.D., Jae Wook Kim, M.D., Yong Won Park, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Women's Health Science, Women's Cancer Clinic,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective: The objective of this study was to investigate the relationship between the expression of mRNA and protein of HLA-G and other clinicopathologic prognostic factors of ovarian cancer.

Methods: 43 patients diagnosed with ovarian cancer from 1997 to 2005 and 5 patients with normal ovarian tissue (controls) were enrolled in this prospective study. The patient group all went through baseline studies with staging laparotomy and adjuvant chemotherapy. Quantitative real-time RT PCR and Western blot analysis were used in detecting the expression of mRNA and protein of HLA-G.

Results: The mRNA expression of HLA-G ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ value) in cancer group were 1.21 (0-9), and 0.01 (0-0.02) in control group, which was statistically significant ($P=0.005$). The expressed protein levels did not show any difference between the cancer and control groups. There also was a significant relationship between the serum CA 125 at the time of diagnosis and the HLA-G protein levels ($P=0.02$). But the relationship between other clinicopathologic prognostic factors and the HLA-G protein levels were not statistically significant.

Conclusion: Our results showed that HLA-G mRNA expression level was much higher in ovarian cancer patient group than in those of control group. Therefore HLA-G maybe play an important role in carcinogenesis of ovarian cancer. Although the protein level of HLA-G had low significance with other prognostic factors, serum CA 125 showed a statistically significant relation with protein levels of HLA-G. Further studies based on the correlation between HLA-G and survival rate are needed to support HLA-G as a prognostic factor of ovarian cancer.

Key Words: Ovarian cancer, HLA-G gene, CA-125, Prognostic factors

서론

난소암은 선진국에서는 발생률이 부인 암 중 2번째로 높으며, 사망률은 전체 암의 4번째 높은 악성 종양이다. 미국의 경우 매년 약 25,000명의 환자가 진단되고 사망률의 3.8%를 차지하는 것으로 보고되었다.^{1,2} 난소암은 초기에는 자각 증상이 거의 없으므로, 대부분 질

접수일 : 2005. 7. 6.
주관책임자 : 김영태
E-mail: ytkimchoi@yumc.yonsei.ac.kr

*본 연구는 2005년도 한국여성암 연구재단 연구비의 지원을 받아 수행되었음.

*This study was supported by a grant of the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (0412-CR01-0704-0001).

병이 상당히 진행된 FIGO (International Federation of Obstetrics and Gynecology) 수술적 병기 III-IV기에 70-75%의 환자가 발견되며, 여전히 완치가 힘든 질환이며 진행성 난소암 환자의 대부분은 불량한 예후를 보인다. 난소암의 예후 인자로 알려진 인자들에는 여러 가지가 있지만 이들 중 중요시되는 것은 병기 (stage), 조직학적 분화도 (histologic grade), 혈청 내 CA-125 수치, 잔류 암의 크기 (residual tumor size), 유세포분석법 (flow cytometry)을 통한 DNA 정량 검사 등이다.³⁻⁵ 난소암의 치료를 위해서 수술요법, 항암화학요법, 방사선요법과 더불어 면역요법을 이용한 다양한 시도가 이루어지고 있는 현실이다. 면역요법을 이용한 방법으로는 cytokines를 이용하여 항암화학요법과 병용하여 사용한 바 있다.⁶

면역학적 관점에서 보았을 때, 종양세포에서 발현되는 항원은 주조직접합체 (major histocompatibility complex, MHC)와 결합하게 되는데 인간에서는 인체 백혈구 항원 (Human leukocyte antigen, HLA)/펩타이드 (peptide) 복합체의 형태로 T세포에 의해 감작된다. 암세포가 이러한 비고전적 MHC class I 발현을 손상시켜 T세포와 암세포간의 반응이 저지된다.⁷ 비고전적 MHC class I gene 중의 한 형태인 HLA-G는 세포막 접합체 형태 (HLA-G1, -G2, -G3, -G4)와 수용성 (HLA-G5, -G6, and -G7)으로 구분되고 있고⁸ 주로 산모-태아 사이에 있어서 산모의 면역 체계로부터 태아를 보호하기 위해 발현되는 것으로 밝혀지게 되었는데 악성 종양세포에서도 면역 회피의 기전과 관련되어 이러한 분자 (molecule)의 발현이 보고되었다.⁹ HLA-G는 NK (natural killer) 세포, T세포 등과 같은 여러 면역학적 인체 방어기전에 관여하는 세포들을 방해함으로써 면역 체계로부터 종양세포를 인지하지 못하도록 하는데 관여한다고 생각되어지고 있다.¹⁰ 실험실 결과에서 단핵구의 HLA-G 분비는 TH1 cytokines에 의해 영향을 받고 있으며, HLA-G의 발현이 T 세포와 NK 세포의 기능을 방해함으로써, 악성 암이 면역 체계로부터의 벗어나게 하고 악성 암의 진행을 도와준다고 발표되었다.¹¹ 또한, HLA-G의 다른 역할은 림프구와 수지상 세

포 (dendritic cell)의 수용체에 결합하여 세포독성 T 림프구의 용해 작용을 저해시키며 cytokines의 생성을 조절하는 작용 및 혈관신생 등에 관여하는 것으로 보고되었다.^{12,13} 악성 흑색종, 신세포암, 폐암, 난소암에 있어서 면역학적으로 암세포에 대하여 HLA-G는 종양의 악성 변화에도 불구하고 체내의 면역 체계로부터의 면역 작용을 방해하는 역할을 하고 있으며 세포 독성에 의한 세포사멸이 HLA-G에 의해 억제된다고 보고되고 있다.¹⁴

기존의 연구에서 발표한 바에 의하면 난소암 조직에서 Western blot analysis를 이용하여 HLA-G의 발현을 보고하였는데 난소암 조직 중 53%에서 HLA-G가 발현되었다고 하고,¹⁵ 또 다른 연구에서는 악성 암 환자 중 난소암에서는 51%, 유방암에서는 25%의 악성 복수 내에서 HLA-G의 발현이 나타났다.¹⁶ 현재까지 난소암에서의 HLA-G 발현에 대한 연구는 극소수 진행된 상태이고, 난소암 조직에서 HLA-G의 mRNA 발현이나 단백질 발현을 동시에 보고한 연구는 아직 전무한 상태이다. 이에 따라 본 저자들은 난소암 조직에서 quantitative real-time RT PCR을 이용하여 HLA-G의 mRNA level을 측정하고, Western blot analysis를 이용하여 protein level을 측정하여, 그 발현 정도가 다른 예후 인자인 난소암의 병기, 혈청 내 CA-125 수치, 유세포 분석법을 이용한 DNA flow cytometry, 림프절전이 유무 등과의 상관성이 있는지를 분석하여 HLA-G가 난소암의 양상과 예후적 인자로서 의의가 있는지에 대해 연구하고자 한다.

연구 대상 및 방법

1. 대상

1997년부터 2005년 현재까지 난소암으로 진단받은 환자 43예를 실험 군으로, 정상 난소조직 5예를 대조 군으로 한 연구를 시행하였다. 모든 악성 난소암 환자는 기초 검사를 시행한 후 병기 결정을 위한 개복술을 시행하였으며, 수술 후 보조 항암화학요법을 시행하였다.

보조 항암화학요법은 43예의 난소암 환자에서 평균 6회 시행하였다.

2. 병리조직검사

세포 형태, 조직학적 분화도와 병기는 WHO criteria와 FIGO 병기에 따라 분류하였다. 조직학적 분화도는 grade 1은 고형성 부분이 5% 미만인 경우, grade 2는 고형성 부분이 5% 이상 50% 미만인 경우, grade 3은 고형성 부분이 50% 이상인 경우로 분류하였다.¹⁷

3. 예후 인자

다양한 예후 인자는 다음과 같은 기준으로 나누었다. 혈청 내 CA-125 수치는 환자가 처음 병원 내원 시의 수치를 기준으로 하였으며, 진단 당시의 난소 종양의 크기, 병기는 개복술 후 판정한 초기 병기 (I, II)와 진행된 병기 (III, IV)로 분류하였고, 림프절 전이 유무, 개복술 후 얻어진 난소 조직의 조직학적 분류, 조직 분화도와 유세포 분석법을 통한 DNA flow cytometry, 수술 후 잔류암의 크기는 장경 2 cm 이하인 경우와 이상인 경우로 분류하였다.

4. 연구 방법

1) Quantitative real-time RT PCR

본원에서 시행한 수술에 의해 얻어진 암 조직을 질소 탱크에 보관하고, 수술적 병기에 따라 암 조직을 선택한 후 실험을 위한 검체를 LN2 gas 내에서 막자 사발을 이용하여 분쇄시킨 후 RNA extraction kit (Promega, Madison, Wisc., USA)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA (1 µg)는 oligo dT를 primer로 해서 역전사 (reverse transcription)를 실시하였다. 역전사를 통한 상보적 DNA (complementary DNA, cDNA) 합성은 역전사 효소 (reverse transcriptase, Formentas life science CA, USA)를 이용했으며 이때의 상태는 70°C 5분, 37°C 60분, 70°C 10분을 사용하였다. 합성

된 cDNA는 -20°C에서 사용 전까지 보관하였다.

실시간 정량 PCR (quantitative real time RT PCR)은 ABI 7700 Prism sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하였다. HLA-G의 mRNA의 발현을 측정하기 위해 사용한 primer는 Applied Biosystems as assay on demand product로 Assay ID는 Hs00365950_g1를 사용하였으며 internal control로 house keeping gene인 GAPDH의 Assay ID는 Hs99999905_mL를 사용하였다.

Quantitative real-time RT PCR 반응은 총 50 µl로 하였으며 TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 primers 그리고 probes를 섞어서 만들었다. 이것을 96-well optical reaction plate (Applied Biosystems, Foster City, CA)에 넣었다. 사용한 thermal cycler parameters는 첫 번째 stage로 50°C에서 2분, 95°C에서 10분, 그리고 두 번째 stage로는 denaturation을 위해 95°C에서 15초, annealing/extension을 위해 60°C에서 1분, 이 과정을 50 cycles 반복했다. 대조 군 세포주로는 JEG3 cell을 이용하였다.

Real-time PCR의 결과는 “comparative Ct method of quantitation” ($\Delta\Delta Ct$ -Threshold Cycles) 방법을 이용했으며, 이 방법은 ABI Prism Sequence Detection System User Bulletin2의 형식을 outline으로 해서 계산되었다.

$$\Delta Ct (\text{sample}) = Ct (\text{target gene}) - \Delta Ct (\text{GAPDH})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{tumor sample}) - \Delta Ct (\text{control})$$

$$\text{Relative expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2) Western Blot analysis

막자 사발을 통해 분쇄시킨 난소조직 샘플들과 세포주 (JEG3 cell)에 lysis buffer (Cell Signaling Technology, Inc. USA)를 넣고 ice에 10분 incubation 한 후에 4°C에서 14000 rpm으로 원심분리하여 가라앉힌 후 세포 상층액을 얻었다. 단백질 정량은 Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용했다. 이렇게 얻은 단백질은 환원제를 포함하는

mini-SDS-PAGE gel (10 or 8%) electrophoresis를 통해 분리시켰다. 전기 영동 후 gel을 PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J., USA)에 상온에서 blotting한 후 5% nonfat dry milk/PBS (TPBS)로 2시간 상온에서 blotting 하였다. 4℃에서 primary HLA-G mAb (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 GAPDH mAb (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)를 밤새 처리하고, TBST washing buffer로 10분씩 3번 씻어 주었다. 세척 후 secondary antibody anti-mouse IgG (horseradish peroxidase conjugated antibody)를 상온에서 1시간 처리하고, TBST로 20분씩 3번 씻어 주었다. 1, 2차 antibody는 5% nonfat dry milk/PBS (TPBS)에 1:1000으로 희석하여 사용하였다. ECL reagents (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) I, II를 1:1로 섞어 membrane과 1분정도 반응시켰다. per X-ray film에 30초, 1분, 5분 노출시켜 얻은 결과에서 단백질 양의 정량화를 위해 laser densitometer와 analysis software (IMAGE READER BAS-1000 lite, Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan)를 이용하여 분석하였다.

5. 통계 분석

통계는 서술적 통계를 사용하였으며 두 그룹 간의 비교 분석에는 Wilcoxon Rank Sums test와 세 그룹 이상 간의 비교 분석에는 Kruskal-Wallis test를 사용하였으며 P-value가 0.05 이하일 때 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 임상 소견

난소암 조직 43예를 실험 군으로 정상 난소조직 5예를 대조 군으로 선정하였다. 43예의 악성 난소암 환자의 연령 중앙값은 51.5세 (18-72세)이었고, 50세 이

상인 환자는 60.5% 였다. 수술적 병기는 각각 I 기 7예 (16.3%), II기 4예 (9.3%), III기 24예 (55.8%), IV기 8예 (18.6%)로 III기가 가장 많았고, I기와 II기를 합쳐 초기 병기, III기와 IV기를 합쳐 진행된 병기로 분류하였을 때, 진행된 병기가 74%에 해당하였다. 그 외의 다른 예후인자들에 대한 임상적 특성은 Table 1과 같다 (Table 1).

Table 1. Clinicopathological characteristics of ovarian cancer patients

	No.	%
Age (years)		
Median	51.5	
Range	18-72	
Stage		
I	7	16.3
II	4	9.3
III	24	55.8
IV	8	18.6
Grade		
1	6	13.8
2	10	23.5
3	27	62.7
Histopathology		
Serous	25	58.2
Mucinous	4	9.4
Clear cell	7	16.2
Undifferentiated	7	16.2
LN metastasis		
Positive	14	32.5
Negative	29	67.5
Residium		
≤2 cm	34	79.1
>2 cm	9	20.9
CA 125 (U/mL)		
≤35	9	20.9
>35	34	79.1
DNA flow cytometry		
Diploidy	15	34.9
Aneuploidy	28	65.1

2. 대조 군 난소조직과 난소암 조직에서 quantitative real time RT-PCR에 의한 HLA-G의 mRNA 발현

분석

신선한 정상 대조 군 난소조직과 난소암 조직에서 HLA-G의 mRNA 발현을 측정하기 위해서 TaqMan probe를 이용한 quantitative real time RT-PCR을 사용하였다. HLA-G의 real time RT-PCR의 정량은 GAPDH를 internal control로 하고 JEG3 cell을 control로 하여 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값을 구하였는데 난소암 조직에서 HLA-G의 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값은 1.21 (0-9)였고, 대조 군 조직에서는 0.01 (0-0.02)로 난소암 조직에서 HLA-G의 mRNA 발현이 증가하였다 ($P=0.005$). 두 그룹 간의 차이는 통계적으로 유의하였다 (Fig. 1, Table 2).

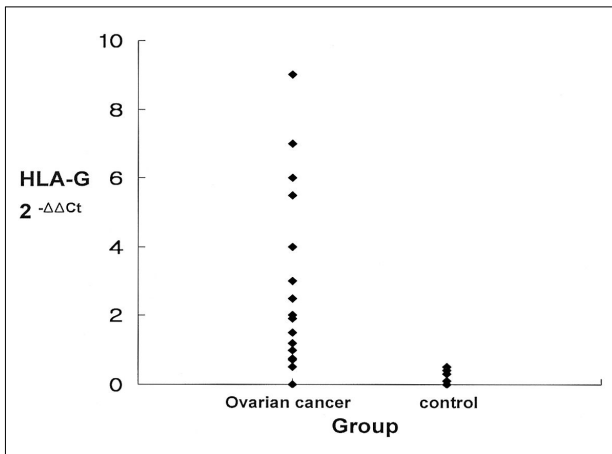


Fig. 1. Comparison of mRNA expression level of HLA-G between control and ovarian cancer group by real time RT-PCR ($P=0.005$).

Table 2. Comparison of mRNA expression level of HLA-G between control and ovarian cancer group by real time RT-PCR

Group	HLA-G ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ value)
	Median (Range)
Control (n=5)	0.01 (0-0.02)
Ovarian cancer (n=43)	1.21 (0-9)*

* $P=0.005$ (ovarian cancer vs. control)

3. 대조 군 난소조직과 난소암 조직에서 Western blot analysis에 의한 HLA-G의 단백질 발현 분석

본 연구에서는 Western blot analysis에 의해 난소암 조직에서 HLA-G의 단백질 발현을 측정하였다 (Fig. 2). 대조 군 난소조직에서의 단백질 발현을 1로 보았을 때, 난소암 조직에서의 HLA-G의 발현은 평균 1.03 (0-1.13)으로 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($P=0.85$).

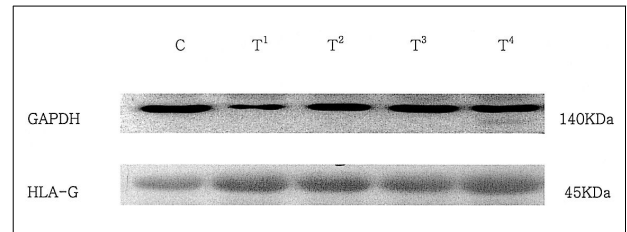


Fig. 2. Comparison of protein level of HLA-G between control and ovarian cancer group by Western blot analysis.

C: control, T: ovarian cancer

T¹: >35 (CA 125), T²: ≤35 (CA 125), T³: early stage, T⁴: advanced stage

4. 난소암 조직에서 HLA-G의 mRNA 발현 및 단백질의 발현과 임상 병리학적 예후 인자들과의 상관성

본 연구에서는 43예의 난소암 환자에서 HLA-G의 mRNA 발현 및 단백질 발현과 임상 병리학적 소견과의 상관성을 보았다 (Table 3). 난소암에서의 HLA-G의 mRNA 발현 및 단백질 발현과 중요한 임상 병리학적 예후인자들 (나이, 병기, 조직학적 분화도, 세포 형, 림프절 전이 여부, 잔류암 크기, 혈청 내 CA 125, 유세포 분석법을 통한 DNA flow cytometry 결과)과의 비교에 있어서 HLA-G 단백질 발현과의 사이에서 진단 당시의 CA 125수치가 35 U/mL 이하인 경우와 35 U/mL보다 높은 경우로 나누었을 때 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 ($P=0.02$), 다른 임상 병리학적 예후 인자들과는 통계적으로 유의한 상관 관계를 보이지 않았다.

Table 3. Level of mRNA and protein expression level of HLA-G in various clinicopathological factors

	No. (%)	RT-PCR $2^{-\Delta\Delta C_t}$ value	Western blot DV [†]
		Median (Range)	
Age (years)			
≤50	17 (39.5)	2.10 (0.09-8.75)	1.0 (0.98-1.12)
>50	26 (60.5)	0.81 (0.12-4.96)	0.98 (0.95-1.13)
Stage			
Early stage (I, II)	11 (25.6)	2.54 (0.12-4.96)	1.01 (0.96-1.09)
Advanced stage (III, IV)	32 (74.4)	0.84 (0.05-7.06)	0.99 (0.95-1.15)
Grade			
1	6 (13.8)	2.10 (0.01-4.96)	1.04 (0.96-1.12)
2	10 (23.5)	1.06 (0.06-4.53)	1.10 (0.99-1.12)
3	27 (62.7)	0.82 (0.27-7.67)	0.99 (0.95-1.07)
Histopathology			
Serous	25 (58.2)	0.45 (0.05-7.06)	1.04 (0.97-1.16)
Mucinous	4 (9.4)	2.10 (2.0-4.96)	0.96 (0.95-1.04)
Clear cell	7 (16.2)	1.0 (0-1.04)	1.03 (0.95-1.13)
Undifferentiated	7 (16.2)	0.91 (0.84-0.99)	0.87 (0.55-0.71)
LN metastasis			
Positive	14 (32.5)	0.90 (0.05-6.59)	0.99 (0.95-1.15)
Negative	29 (67.5)	1.42 (0.45-4.96)	0.99 (0.95-1.12)
Residuum			
≤2 cm	34 (79.1)	0.84 (0.09-4.96)	1.01 (0.95-1.15)
>2 cm	9 (20.9)	0.83 (0.71-0.90)	0.98 (0.95-1.07)
CA 125 (U/mL)			
≤35	9 (20.9)	0.79 (0.12-2.0)	0.95 (0.94-0.96)
>35	34 (79.1)	1.47 (0.05-7.06)	1.03 (0.96-1.15)*
DNA flow cytometry			
Diploidy	15 (34.9)	0.84 (0.45-4.96)	0.98 (0.95-1.07)
Anueploidy	28 (65.1)	1.02 (0.01-6.59)	1.06 (0.94-1.18)

[†] DV; densitometer value, * P=0.025

고 찰

최근에 난소암의 치료를 위한 면역학적 측면에서의 접근이 대두되는 가운데, Windbichler 등은 interferon- γ 와 platinum-based 항암화학요법을 이용한 면역학적 치료를 보고하였고,¹⁸ 또한, 난소암에서 interferon- α 의 복강 내 주입으로 NK 세포의 암세포에 대한 세포독성 및 세포사멸 기능을 증진시킨다는 연구도 보고되고 있다.¹⁹ 이와 같이 면역학적인 측면에서

난소암의 치료에 접근하는 가운데 이미 신세포암이나 악성 흑색종 등에서 암세포의 표면에 발현되어 암세포를 인체의 면역학적 방어 기전으로부터 보호하는 역할을 하는 HLA-G가 보고되었다.^{20,21}

HLA-G는 비고전적 MHC class I 항체로써 면역학적으로 CD94/NKG2의 이질 이합체 (heterodimer)로 CD8 T 세포의 수용체에 접합하여 NK 세포와 상호 작용을 하게 된다. 그 기전이 정확하게 밝혀지지는 않았지만 HLA-G는 직접적 혹은, 간접적으로 NK 세포의 면역학

적 세포사멸을 방해하게 된다.²² 이러한 악성 암에서의 HLA-G의 발현과 역할의 특징을 밝혀내는 연구가 최근 몇 년간 급진적으로 발전하는 가운데, HLA-G의 생물학적인 중요성은 아직 확립된 바 없지만 암세포와 인체 내의 면역세포 (phagocytes) 사이의 상관 관계에서 중요한 역할을 한다고 생각된다. Urosevic 등은 HLA-G는 폐암과 림프종에서 interleukin-10에 의해 발현이 상향 조절되어 Th2-type의 면역학적 기전에 따라 인체 내의 면역학적 기전으로부터 암세포를 보호하는 역할을 한다고 보고하였다.^{23,24} 이러한 이론은 신세포암이나 악성 흑색종에서도 보고되었다.^{20,21}

Malmberg 등은 난소암 조직에서 Western blot을 이용하여 HLA-G의 발현을 보고하였는데 난소암 조직 중 53%에서 HLA-G가 발현되었다고 하였다.¹⁵ 본 연구에서는 real time RT-PCR을 시행하여 난소암 조직의 약 88%에서 HLA-G의 발현이 보고되었다. 기존의 연구들보다 높은 발현율을 보인 이유는 본 연구에서는 real time RT PCR을 사용하였는데, real-time RT PCR은 PCR보다 더 정량적이고, 만약 두 실험 방법 모두 40 cycle을 돌린다면 PCR은 40번을 돌린 후의 gene expression 결과만 확인할 수 있으나 real-time RT PCR은 각 cycle마다 얼마만큼의 gene expression이 되고 있는지를 확인할 수 있기 때문이다. 왜냐하면 PCR과 다르게 real-time RT PCR에 사용하는 primer에는 probe라는 것이 포함되어 있어서 각 cycle마다 기계가 체크를 할 수 있게 된다. 이러한 차이로 인해 본 연구에서는 기존의 다른 연구에 비해 HLA-G의 발현이 높게 나타났다고 생각한다.

또한 Singer 등은 악성 종양환자의 복수에서 HLA-G를 검출하였고 난소암 환자 중 61%, 유방암 환자 중 25%에서 HLA-G의 발현을 보고하였으며, 이는 정상 조직이나 양성 질환 조직에서는 발현이 되지 않는 것으로 보고하였다.¹⁶ Davidson 등은 난소암 환자의 삼출액에서 면역조직화학염색법을 사용하여 HLA-G를 검출하였는데 이는 난소의 고형암을 가진 환자의 50% 이상에서 검출되었고, 항암화학요법 중이나 그 이후에는 HLA-G의 발현이 감소하였다고 보고하였다.²⁵ 또한

FIGO 병기, 조직학적 분화도, 잔류암의 크기 등의 예후 인자와는 상관관계는 없지만 HLA-G가 발현된 난소암 환자 군이 항암화학요법에 더 좋은 반응을 보이며 더 좋은 생존율을 보였다고 보고하였다.²⁵ 이는 아직 확실한 면역학적 기전은 밝혀지지 않았지만 HLA-G가 발현된 군에서 항암화학요법 후에 손상 받은 암세포를 NK 세포가 사멸시키는데 상호 관련이 있다고 예측하고 있으며, 이 부분에 관하여는 향후 심화된 연구가 필요하다고 사료된다.

난소암의 중요한 예후 인자에는 병기, 조직학적 분화도, 혈청 내 CA-125 수치, 잔류암의 크기, 유세포 분석법 등이 있는데,^{26,27} 본 연구에서는 이러한 다양한 임상 병리학적인 예후 인자들과 더불어 면역학적인 예후 예측 인자로서 HLA-G에 대해 분석하였다. HLA-G의 mRNA는 암 조직에서 정상 대조 군에 비해 통계적으로 유의하게 높게 나타났으나, 단백질 발현은 정상 대조 군과 큰 차이를 보이지 않았다.

HLA-G의 mRNA 발현이나 단백질 발현과 다른 임상 병리학적 예후 인자들인 FIGO 병기, 조직학적 분화도, 잔류암의 크기, 세포 형, 유세포 분석 결과와의 비교에 있어서는 통계적으로 유의한 상관성을 보이지 않았으나, 암 조직에서의 HLA-G 단백질 발현이 환자 혈청 내의 CA 125 수치와 통계적으로 유의한 상관 관계를 보였다. 폐암을 대상으로 한 다른 연구에서는 종양의 조직학적 등급에 따라 HLA-G의 발현에 차이가 있다고 보고하고 있으나,²³ 난소암에서는 아직 조직학적 등급이나, 임상적 특성과 HLA-G의 발현과의 명확한 연관성은 없는 것으로 조사되고 있다. 본 연구의 결과로 보아 HLA-G가 난소암이 신체 내의 세포독성 항 종양 반응에 대한 회피에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다.

결론적으로 본 연구에서는 HLA-G가 정상 대조 군 난소에 비해 난소암에서 높게 발현됨이 관찰되었고, 이는 난소암의 암 발생기전 (carcinogenesis)에 있어서 HLA-G가 중요한 역할을 하고 있다고 사료된다. HLA-G의 단백질 발현은 다른 예후 인자들과는 통계적으로 유의한 상관 관계를 보이지 않았지만, 예후 인자

중 하나인 혈청 내 CA 125 수치와는 유의한 상관 관계를 보이는 결과를 나타내었다. 향후 HLA-G의 발현 정도와 생존율과의 상관 관계에 관한 연구가 추가로 뒷받침된다면 HLA-G의 발현이 난소암의 예후 인자로 사용될 수 있으리라고 생각된다.

참고문헌

- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001; 51: 15-36.
- 보건복지부. 한국중양암등록 사업 연례보고서. 서울, 2003.
- Holschneider CH, Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 3-10.
- 이종승, 김영태, 김재욱, 박기현, 김성훈. 난소 중앙 환자에서 유세포 분석을 통한 DNA 정량검사의 예후적 의의. *대한산부회지* 2004; 47: 1100-6.
- 조남훈, 김영태, 김성훈, 노종환, 김재욱. 상피성 난소암에서 핵 DNA 정량검사와 Cyclin A의 예후적 의의. *대한산부회지* 2004; 47: 1309-16.
- Baker W. Molecular biology and genetics of epithelial ovarian cancer in update on epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1994; 21: 25-40.
- Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 3-13.
- Carosella ED, Paul P, Moreau P, Rouas-Freiss N. HLA-G and -E: fundamental and physiopathological aspects. *Immunol Today* 2000; 21: 532-4.
- Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4510-5.
- Rouas-Freiss N, Marchal RE, Kirszenbaum M, Dausset J, Carosella ED. The alpha1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells: is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors? *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5249-54.
- Rebmann V, Busemann A, Lindemann M, Grosse-Wilde H. Detection of HLA-G5 secreting cells. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 371-7.
- Colonna M, Samaridis J, Cella M, Angman L, Allen RL, O'Callaghan CA, et al. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol* 1998; 160: 3096-100.
- Allan DS, Colonna M, Lanier LL, Churakova TD, Abrams JS, Ellis SA, et al. Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med* 1999; 189: 1149-56.
- Ibrahim el C, Aractingi S, Allory Y, Borini F, Dupuy A, Duvillard P, et al. Analysis of HLA antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype. *Int J Cancer* 2004; 108: 243-50.
- Malmberg KJ, Levitsky V, Norell H, de Matos CT, Carlsten M, Schedvins K, et al. IFN-gamma protects short-term ovarian carcinoma cell lines from CTL lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *J Clin Invest* 2002; 110: 1515-23.
- Singer G, Rebmann V, Chen YC, Liu HT, Ali SZ, Reinsberg J, et al. HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4460-4.
- Serov F, Scully RE, Solbin LE. Histologic typing of ovarian tumors. In: *International Classification of Tumors*. Geneva: World Health Organization, 1973.
- Windbichler G, Hausmaninger H, Stummvoll W, Graf AH, Kainz C, Lahodny J, et al. γ -interferon reduces expression of the protooncogene c-erb-2 in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 1990; 50: 7037-41.
- Berek JS, Welandar C, Schink JC, Grossberg H, Montz FJ, Zigelboim J. A phase I-II trial of intraperitoneal cisplatin and α -interferon in patients with persistent epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1991; 75: 10-4.
- Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, et al. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4510-5.
- Ibrahim EC, Guerra N, Lacombe MJ, Angevin E, Chouaib S, Carosella ED, et al. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 6838-45.
- Pazmany L, Mandelboim O, Gomez VM, Daniel MD, Todd CB, Hugh TR, et al. Human leucocyte antigen-G and its recognition by natural killer cells. *J Reprod Immuno* 1999; 43: 127-37.
- Urošević M, Kurrer MO, Kamarashev J, Mueller B, Weder W, Burg G, et al. Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production. *Am J Pathol* 2001; 159: 817-24.
- Urošević M, Willers J, Mueller B, Kempf W, Burg G, Dummer R. HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood* 2002; 99: 609-17.
- Davidson B, Elstrand MB, McMaster MT, Berner A, Kurman RJ, Risberg B, et al. HLA-G expression in effusion is a possible marker of tumor susceptibility to chemotherapy in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005; 96: 42-7.
- Omura GA, Brady MF, Homesley HD, Yordan E, Major FJ, Buchsbaum HJ, et al. Long-term follow-up and prognostic factor analysis in advanced ovarian carcinoma: the Gynecologic Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 1991; 9: 138-50.
- Baak JP, Chan KK, Stolk JG, Kenemans P. Prognostic factors in borderline and invasive ovarian tumors of the common epithelial type. *Pathol Res Pract* 1987; 182: 755-74.

= 국문초록 =

목적: 본 연구의 목적은 악성 난소암에서 quantitative real-time RT PCR과 Western blot analysis를 이용하여 HLA-G의 mRNA와 단백질의 발현 정도를 측정한 후, 이의 발현 정도에 따라 HLA-G의 발현의 의미와 난소암의 다른 예후 인자들과의 상관 관계를 조사하는 것이다.

연구 방법: 1997년부터 2005년 현재까지 난소암으로 진단받은 환자 중 43명의 난소 조직을 실험 군으로, 정상 난소 조직 5예를 대조 군으로 하여 전향적인 연구를 시행하였다. 악성 난소암 환자는 기초 검사를 시행한 후 병기 결정을 위한 개복술을 시행하였으며 수술 후 보조 항암화학요법을 시행하였다. Quantitative real time RT PCR과 Western blot analysis를 이용하여 HLA-G의 mRNA와 단백질의 발현을 측정하였다.

결과: 난소암 조직에서의 HLA-G의 mRNA 발현의 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 의 median값은 1.21 (0-9)였고, 대조 군 난소 조직에서의 median값은 0.01 (0-0.02)로 나타나 난소암 조직과 대조 군 난소 조직 사이에 HLA-G의 mRNA 발현 차이는 통계적으로 유의하였다 ($P=0.005$). Western blot analysis에 의해 난소암 조직과 대조 군 난소 조직에서의 단백질 발현은 거의 차이를 보이지 않았으며, 통계적 유의성이 없었다. 난소암에서의 HLA-G의 mRNA 발현 및 단백질 발현과 임상 병리학적 예후 인자와의 비교에 있어서, 진단 당시의 혈청 내 CA 125 수치와 HLA-G 단백질 발현과의 사이에서 통계적으로 유의한 상관성을 보였으며 ($P=0.02$), 다른 임상 병리학적 예후 인자들과는 통계적으로 유의한 상관 관계를 보이지 않았다.

결론: HLA-G가 정상 대조 군 난소에 비해 난소암에서 높게 발현되므로 난소암의 암 발생기전 (carcinogenesis)에 있어서 HLA-G가 중요한 역할을 하고 있다고 판단된다. HLA-G의 단백질 발현은 다른 예후 인자들과는 통계적으로 유의한 상관 관계를 보이지 않았으나, 예후 인자 중 하나인 혈청 내 CA 125 수치와 유의한 상관관계를 나타내었다. HLA-G가 예후 예측인자로 사용되기 위해서는 향후 생존율과 연관된 연구가 추가로 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

중심단어: 난소암, HLA-G gene, CA-125, Prognostic factors
